

SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgG

SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in humanem Serum oder Plasma

REF SP-010-4 G-S6 ▽ 48 REF SP-010-4 G-S12 ▽ 96 REF SP-010-4 G-S24 ▽ 2x 96

IVD In-vitro-Diagnostikum CE

REF SP-010-4 M-S6 ▽ 48 REF SP-010-4 M-S12 ▽ 96 REF SP-010-4 M-S24 ▽ 2x 96

IVD In-vitro-Diagnostikum CE



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 33767 791-10 · Fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Einführung

Treponema pallidum ssp. pallidum ist der Erreger der Syphilis, einer weltweit verbreiteten, sexuell übertragbaren Erkrankung des Menschen mit regional unterschiedlichen Neuerkrankungsraten. In westlichen Industriestaaten wird seit 2000 ein Wiederanstieg der Erkrankungszahlen beobachtet. Die Inzidenz liegt aktuell bei ca. 2 - 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (1).

Der klinische Verlauf der Syphilis ist durch verschiedene Stadien unterschiedlicher symptomatischer Bandbreite charakterisiert. Die Infektion mit *Treponema pallidum* erfolgt durch sexuelle Kontakte, wobei der Erreger an der Infektionsstelle, die im Genital-, Oral- oder Analbereich liegen kann, durch Mikroverletzungen oder auch intakte Schleimhäute eindringt. Von dort breiten sich die Treponemen systemisch über Blut- und Lymphgefäße aus. In diesem Primärstadium entwickelt sich an der Infektionsstelle eine schmerzlose Ulzeration (Ulcus durum oder auch harter Schanker) und der Befall der regionären Lymphknoten führt zur Lymphadenopathie. Unbehandelt geht die Infektion nach ca. 9-10 Wochen in das Sekundärstadium über, welches sich klinisch typischerweise in Form eines makulopapulösen Exanthems oder anderen ulzerativen Hautveränderungen äußert. Daneben treten aber auch eine Reihe weiterer, z.T. weniger charakteristischer Symptome wie generalisierte Lymphknotenschwellung, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, subfebrile Temperaturen u.a. auf. In den blasigen Hautausschlägen ist der Erreger in großer Zahl enthalten. Im Verlaufe des Wochen bis Monate dauernden Sekundärstadiums werden Erreger-spezifische Antikörper gebildet. Reinfektionen sind dennoch möglich. Nach Abklingen der Symptome und einer längeren, z.T. mehrjährigen Latenzzeit wird schließlich das Tertiärstadium erreicht. Es ist durch vielfältige Symptomenkomplexe in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Organmanifestation gekennzeichnet. Bei Beteiligung des Zentralnervensystems kann sich das Tertiärstadium klinisch in Form der Neurosyphilis oder anderer neurologischer Symptome manifestieren (1, 2).

Eine Syphilis-Infektion während der Schwangerschaft kann zur transplazentaren Übertragung des Erregers auf den Fetus (konnatale Infektion) führen, was in über 40 % der Fälle Abort, Totgeburt oder

Frühgeburt zur Folge hat. Die Ausprägung der Erkrankung beim Neugeborenen (Syphilis neonatorum) reicht von klinischer Unauffälligkeit (50 – 70 % der infizierten Kinder) über blutigen Schnupfen, Haut- und Schleimhautirritationen und Fieber bis hin zu Ödemen, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Enteritis, Hydrocephalus und Meningitis. In seltenen Fällen treten klinische Symptome erst im Kleinkindalter auf (3, 4).

Die Therapie der Syphilis erfolgt antibiotisch. Mittel der Wahl ist Penicillin G; alternativ sind Tetrazykline und Cephalosporine wirksam (3).

Die Diagnostik einer *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Infektion kann direkt (Erreger- oder Nukleinsäurenachweis) oder indirekt (serologischer Nachweis) erfolgen.

Der direkte Erregernachweis aus Primärläsionen, Lymphknotenpunktaten oder Abstrichen aus Exanthenen des Sekundärstadiums gelingt mittels Dunkelfeldmikroskopie oder im direkten Immunfluoreszenztest mit markierten Erreger-spezifischen Antikörpern. Der Nachteil dieser Methoden besteht in der Notwendigkeit der Testdurchführung unmittelbar nach Entnahme des Probenmaterials. Nukleinsäureamplifikationstechniken wie die PCR können aus Abstrichen, Punktaten, Blut oder Liquor durchgeführt werden. Die diagnostische Aussage ist zurzeit aber noch fraglich (2, 5).

Für die Labordiagnostik einer Syphilisinfektion werden in erster Linie serologische Methoden zum Nachweis Erreger-spezifischer Antikörper aus Serum, Plasma oder aus Liquor empfohlen. Die Vorgehensweise folgt einer Stufendiagnostik bestehend aus einem Suchtest und einem Bestätigungstest (1, 2, 6).

Als Suchtest werden *Treponema pallidum*-Hämagglutinationstest (TPHA), *Treponema pallidum*-Partikelagglutinationstest (TPPA) oder ein polyvalenter Enzymimmunoassay (ELISA), der alle Antikörper-Isotypen erfasst, eingesetzt. Ein positives Suchtestergebnis muss mit einem Bestätigungstest überprüft werden.

Als Bestätigungstest hat sich der Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorptionstest (FTA-ABS-Test) etabliert. Auf Objektträgern fixierte Treponemen dienen als Testantigene für den Antikörpernachweis aus der Patientenprobe. Zur Eliminierung potentiell kreuzreagierender Antikörper müssen die Patientenproben aber mit *Treponema phagedenis* („Reiter-Treponemen“) vorinkubiert werden, um ausreichende Testspezifität zu erzielen. Alternativ zum FTA-ABS-Test kann auch ein Immunoblot oder Line Immunoassay als Bestätigungstest eingesetzt werden. Bei diesen Methoden werden Antikörper gegen verschiedene *T. pallidum* Antigene nachgewiesen (2, 4, 7). Gegenüber dem Immunoblot bietet der Line Immunoassay den Vorteil, dass ausschließlich die als *T. pallidum* spezifisch anerkannten Proteinantigene Tp47, Tp17, Tp15 und TmpA in Form hochreiner, rekombinanter Proteine eingesetzt werden (8). Aufgrund ihrer Species-Spezifität sind unerwünschte Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen kommensalische Treponemen nahezu ausgeschlossen und eine Vorabsorption ist nicht mehr erforderlich (7). Zur Differenzierung zwischen einer frischen, aktiven und einer zurückliegenden Infektion sollten im Bestätigungstest IgM- und IgG-Antikörper getrennt bestimmt werden. Die Bestimmung von IgM-Antikörpern zur Beurteilung der Aktivität der Infektion kann mittels IgM Immunoblot oder Line Immunoassay oder 19S-IgM-FTA-ABS Test erfolgen. Da IgM-Antikörper über Monate bis Jahre persistieren können, ist bei positivem IgM-Antikörperbefund die Berücksichtigung klinisch-anamnestischer Befunde unbedingt in eine Therapieentscheidung mit einzubeziehen (2).

Als serologische Verlaufskontrolle nach Therapie werden quantitative Nachweisverfahren wie IgM-ELISA, 19S-IgM-Test oder Lipoidantikörpernachweis (z.B. VDRL-Test, Cardiolipin-KBR) empfohlen (2, 4, 6).

Literatur:

1. Thomas, L. (Hrsg): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main; 5. Auflage 1998
2. Hagedorn, H.-J.; Brockmeyer, N.H.; Hunfeld, K.P.; Münstermann, D.; Potthoff, A.; Schöfer, H.: Syphilis. Mikrobiologisch-inferiologische Qualitätsstandards (MiQ) 16; Urban und Fischer, München; 2. Auflage 2012
3. Brandis, H.; Eggers, H.J.; Köhler, W.; Pulverer, G. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York; 7. Völlig neu bearbeitete Auflage 1994
4. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) online (Hrsg.): Diagnostik und Therapie der Syphilis. Leitlinien der Deutschen STD Gesellschaft. 07/2008

5. Bundesministerium für Gesundheit (Hrsg.): *Treponema pallidum*. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2002; 45: 818-826
6. Neumeister, B.; Geiss, H.K.; Braun, R.W.; Kimmig, P. (Hrsg): *Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 2. Vollständig überarbeitete Auflage 2009
7. Larsen, S.A.; Steiner, B.M.; Rudolph, A.H.: *Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 1995; Vol. 8, No. 1; p1-21
8. Sambri, V.; Marangoni, A.; Eyer, C.; Reichhuber, C.; Soutschek, E.; Negosanti, M.; D'Antuono, A.; Cevenini, R.: *Western Immunoblotting with Five Treponema pallidum Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis*. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, May 2001; Vol. 8, No. 3; p.534-539

Anwendungsbereich

Der SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgG / SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM ist ein *In-vitro*-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von *Treponema pallidum*-spezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma. Der Test kann als Bestätigungstest nach positivem oder fraglichem Syphilis-Suchtest eingesetzt werden.

Testprinzip

Der SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgG / SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM Test ist ein Festphasen-immunoassay basierend auf der Verwendung rekombinanter *Treponema*-Antigene, die in Array-anordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind und die als Fänger-moleküle für Antikörper gegen *Treponema*-Antigene dienen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-human IgG- bzw. IgM-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausgebildet haben, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitations-Produkte der farblosen Substratlösung. Die Farbintensität der Spots korreliert mit der Antikörperkonzentration. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit POD-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgG- bzw. IgM-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörpern durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit Substratlösung SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Substratlösung. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die Färbung der entwickelten Arrays ist bei dunkler Lagerung stabil.

Innerhalb von 24 h nach Beendigung der Nachweisreaktion können von den entwickelten Analysen mit den Scannern Seramun SpotSight® plate oder Seramun SpotSight® strip Bildaufnahmen der Kavitäten (Images) erstellt und unter Verwendung der Software Seramun SpotSight® scan quantitativ analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Verwendete *Treponema*-Antigene

Bezeichnung	Charakterisierung	Spezifität
Tpp15	<i>Treponema pallidum</i> protein 15	15 kD
Tpp17	<i>Treponema pallidum</i> protein 17	17 kD
Tpp47	<i>Treponema pallidum</i> protein 47	47 kD
TmpA	<i>Treponema</i> membrane protein A	37 kD

Die aufgeführten Antigene sind hochspezifisch für alle Infektionsstadien.

Testkomponenten

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x96 Bestimmungen
1	WELLS Kavitäten mit Arrays	6 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
IgG-Bestimmung: Farbmarkierung schwarz; IgM-Bestimmung: Farbmarkierung weiß				
2	WASHBUF CONC 10X Waschpuffer Seramun® Wash buffer A	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe
3	DIL Probenverdünnungs- puffer Seramun® Sample diluent B	55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt, transparente Flasche schwarze Kappe	2x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt, transparente Flasche schwarze Kappe	4x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt, transparente Flasche schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG Anti-human IgG- POD- Konjugat oder CONJ HRP IgM Anti-human IgM- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe 8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe 8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe 2x 8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe
5	SUBSTR TMB Substrat 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe
6	COVER Abdeckfolie	2x	2x	4x
7	SWAB Tupfer mit 70% (v/v) Isopropylalkohol	3x2	6x2	12x2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2...8 °C gelagert werden. Serum sollte nach der Gerinnung so schnell wie möglich abzentrifugiert werden. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (z.B. 10 µl Probe und 1000 µl Puffer) mit dem gebrauchsfertigen Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

• Einstellbare Einkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen • Einstellbare Mehrkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen • Reagenziencontainer für Mehrkanal-Mikropipetten • destilliertes oder deionisiertes Wasser • Fusselfreies Filterpapier • Teströhrchen (1 ml) zur Probenverdünnung • Becherglas und Messzylinder • Stoppuhr • Washer für 96well-Mikrotiterplatten (optional) • Auffanggefäß für infektiöse Lösungen • Seramun *SpotSight*[®] plate oder Seramun *SpotSight*[®] strip Scanner mit Auswertesoftware Seramun *SpotSight*[®] scan

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 48, 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und vakuumversiegelten Testkomponenten ist bei 2...8 °C-Lagerung bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 4 Wochen und bei einer Lagerung bei RT bis zu 2 Wochen verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien und die vakuumversiegelten Testkomponenten auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenbeutel in den Folienbeutel zurücklegen und verschließen.

1 Teil Waschpufferkonzentrat **WASHBUF CONC 10X** mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Waschlösung ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen. Das Substrat **SUBSTR TMB** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen! Der Test darf nicht durchgeführt werden, sollte die Substratlösung **SUBSTR TMB** dunkel gefärbt sein oder dunkle Partikel aufweisen!

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Testdurchführung

Durchführung bei Raumtemperatur (18...25 °C). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Für die Handhabung der SeraSpot® Teste wird empfohlen, den Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) zu verwenden. Der Kit ist zum mehrfachen Gebrauch konzipiert.

Wichtige Hinweise:

- **Mechanischer Kontakt (Kratzen) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Washer-Nadeln ist zu vermeiden. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!**
- **Alle Flüssigreagenzien (Probe, Konjugat und Substrat) sind blasenfrei in die Kavitäten einzubringen!**
- **Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln mit dem im Kit enthaltenen Tupfer **SWAB** zu reinigen!**
- **Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.**

Arbeitsschritte

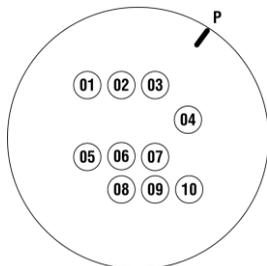
1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1 : 101 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 1000 µl Probenverdünnungspuffer.
3. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
4. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
5. **50 µl** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** oder **CONJ HRP IgM** pro Kavität pipettieren.
6. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
7. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
8. **50 µl** der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung **SUBSTR TMB** pro Kavität pipettieren.
9. Platte abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
10. Substratlösung absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
11. Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
12. Bildaufnahme der Kavitäten mit dem Scanner Seramun SpotSight® plate / Seramun SpotSight® strip und Imageanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan. Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

Es wird empfohlen, für die Absaug- und Waschschrte einen Washer für 96well-Mikrotiterplatten zu verwenden!

Nach dem Absaugen der Substratlösung sind die entwickelten Spots in der Platte bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 Stunden stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout



Parameter

04	TppA
05	Tpp15
06	Tpp17
07	Tpp47

Kontrollen

01	Positivkontrolle (PC)
02	Cut-off Kontrolle (CO)
03	Negativkontrolle (NC)
08	IgG Konjugatkontrolle (GC)
09	IgM Konjugatkontrolle (MC)
10	Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM Test enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO). Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameterspezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC). Sehr schwach gefärbter Spot, die Farbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Funktionskontrolle (IgG, IgM Konjugatkontrolle, GC, MC). Intensiv gefärbte Spots mit unterschiedlicher Position beim IgG- bzw. IgM-Nachweis. Dient zur Kontrolle des Antikörperisotyps.
5. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe im Well befunden hat. Ein Ausbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf das Fehlen von Probe hin.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eine der unter Punkt 1. bis 5. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung der *SeraSpot*[®] Mess- und Auswertetechnik. Eine visuelle Plausibilitätskontrolle ist mit Hilfe der im Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) enthaltenen Lupe möglich.

Die Ergebnisse werden wie folgt zu interpretiert:

Bewertung	IgG	IgM
negativ	max. ein Antigen-Spot > Cut-off Kontrolle	kein Antigen-Spot > Cut-off Kontrolle
grenzwertig	-	ein Antigen-Spot > Cut-off Kontrolle
positiv	zwei oder mehrere Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle	zwei oder mehrere Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle

Grenzen der Methode

Eine Interpretation der Ergebnisse muss in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Kontamination der Reagenzien oder Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Bei der Interpretation von isoliert positiven IgM-Ergebnissen bei Schwangeren, ist die Möglichkeit des Vorhandenseins multireaktiver IgM-Antikörper zu berücksichtigen (siehe „Einleitung“).

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben (Konzentration bis zu 500 mg/dl Hämoglobin, 1000 mg/dl Lipide, 20 mg/dl Bilirubin C / Bilirubin F) und Rheumafaktoren (500 IU/ml) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Testdurchführung

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können zu falschen Ergebnissen führen.

Das Einbringen von Luftblasen beim Pipettieren der Proben und/oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Durch Kratzer auf dem Wellboden beschädigte Arrays sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Im Arraybereich anhaftende Fasern oder Partikel interferieren mit der Imageanalyse.

Leistungsmerkmale

Diagnostische Sensitivität

Ein Kollektiv von 231 bzw. 203 mittels Referenztest (Line-Immunoassay) vorcharakterisierten Proben wurde im *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG bzw. *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM Test untersucht (initiale Sensitivität). Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Referenztest nachgetestet, wobei die im Referenztest 2 erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der im *SeraSpot*[®] Assay zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienen („berichtigte Sensitivität“).

IgG	n = 231	Referenztest 1		
		positiv	grenzwertig	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Treponema-4 IgG	positiv	210	2	5
	grenzwertig	./.	./.	./.
	negativ	3	0	11

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Sensitivität: **98,6 %**

Berichtigte Sensitivität: **98,6 %**

IgM	n = 203	Referenztest 1		
		positiv	grenzwertig	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Treponema-4 IgM	positiv	56	0	0
	grenzwertig	17	17	7
	negativ	1	4	101

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Sensitivität: **94,7 %**

Berichtigte Sensitivität: **95,7 %**

Diagnostische Spezifität

Ein Kollektiv von 382 Blutspendersonen wurde im *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM Test im Vergleich zu einem Referenztest (Line-Immunoassay, Referenztest 1) untersucht. Proben mit diskrepanten Resultaten wurden, wie unter „Diagnostische Sensitivität“ beschrieben, getestet und bewertet.

IgG	n = 382	Referenztest 1		
		positiv	grenzwertig	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Treponema-4 IgG	positiv	0	0	0
	grenzwertig	./.	./.	./.
	negativ	0	0	382

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Spezifität: **100,0 %**

IgM	n = 382	Referenztest 1		
		positiv	grenzwertig	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Treponema-4 IgM	positiv	0	0	0
	grenzwertig	0	0	8*
	negativ	0	0	374

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

*2 Proben wurden in einem 2. Referenztest grenzwertig und eine Probe positiv bestätigt

Initiale Spezifität: **97,9 %**

Berichtigte Spezifität: **98,7 %**

Kreuzreaktivität

Serumproben von Schwangeren (n=51) wurden im *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM Test untersucht. Im IgG-Nachweis waren alle 51 Proben negativ (Spezifität 100 %), im IgM-Nachweis wurden 2 Proben positiv bestimmt (initiale Spezifität 96,1 %). 1 Probe wurde in einem 2. Referenztest positiv bestätigt (Berichtigte Spezifität 98,0 %).

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM Test untersucht und die Farbintensitäten der Spots (RAW) gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten (Mittelwert) wurden die Variationskoeffizienten (VK) ermittelt.

IgG-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	RAW [\bar{x}] n = 8	VK [%]	RAW [\bar{x}] n = 48	VK [%]	RAW [\bar{x}] n = 144	VK [%]
Tpp15	54,6	6,7	111,7	9,7	63,9	8,8
Tpp17	120,2	3,1	110,3	7,6	73,5	9,6
Tpp47	107,0	6,4	103,3	7,7	92,0	8,7
TmpA	112,3	5,3	98,1	6,1	113,7	11,0
Durchführung	1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 3 Chargen	

IgM-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	RAW [\bar{x}] n = 8	VK [%]	RAW [\bar{x}] n = 48	VK [%]	RAW [\bar{x}] n = 144	VK [%]
Tpp15	72,0	9,8	48,2	10,7	79,8	13,3
Tpp17	111,7	8,2	76,6	8,5	116,8	10,3
Tpp47	50,9	9,1	74,4	12,5	56,0	16,6
TmpA	69,5	10,9	59,7	12,1	66,1	11,5
Durchführung	1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 3 Chargen	

Automatisierbarkeit

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität (IgG n=96, IgM n=64) wurden manuell sowie mit dem Mikrotiterplatten-Prozessor DS2[®] (Dynex Technologies; manuelle Probenvorverdünnung) abgearbeitet. Aus den gemessenen Farbintensitäten der Spots (RAW) wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den verschiedenen Methoden der Durchführung ermittelt.

Ig-Isotyp-Nachweis	Dynex DS2 [®] vs. manuelle Abarbeitung	
	r^2 IgG	r^2 IgM
Tpp15	0,979	0,968
Tpp17	0,979	0,990
Tpp47	0,975	0,980
TmpA	0,979	0,970

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden.

Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer und TMB-Substratlösung. Diese sind Chargen- und Parameter-übergreifend verwendbar.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2019-06-XX	Allgemein Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien	Generelle Überarbeitung Lagerung gebrauchsfertiger Waschpuffer

Inkubationsschema SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgG / IgM

- | | | |
|----|---|---|
| 1. | 
100 µl
30 min

3 x Waschen | Verdünnte Probe (1 : 101)
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 2. | 
50 µl
30 min

3 x Waschen | Konjugat CONJ HRP IgG oder CONJ HRP IgM
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 3. | 
50 µl
30 min

Absaugen | Substratlösung SUBSTR TMB
Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur) |
| 4. | Bildaufnahme der Kavitäten
und Imageanalyse | Scanner Seramun <i>SpotSight</i> ® plate / Seramun
<i>SpotSight</i> ® strip und Software Seramun
<i>SpotSight</i> ® scan |

 Hersteller	 Herstellungsdatum	 Verwendbar bis	LOT Charge	REF Artikelnummer
 Vor Sonnenlicht schützen	 Temperaturbegrenzung	 Biologische Risiken	 Nicht wiederverwendbar	
 Gebrauchsanweisung beachten	 Achtung	IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	 Ausreichend für <n> Prüfungen	

SeraSpot[®] Anti-Treponema-4 IgG **SeraSpot[®] Anti-Treponema-4 IgM**

Spotimmunoassay for detection of IgG or IgM antibodies to *Treponema pallidum*
in human serum or plasma

REF SP-010-4 G-S6 ▽ 48 REF SP-010-4 G-S12 ▽ 96 REF SP-010-4 G-S24 ▽ 2x 96

IVD *In-vitro*- diagnostic device CE

REF SP-010-4 M-S6 ▽ 48 REF SP-010-4 M-S12 ▽ 96 REF SP-010-4 M-S24 ▽ 2x 96

IVD *In-vitro*- diagnostic device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Introduction

Treponema pallidum ssp. *pallidum* is the causative agent of Syphilis, a sexually transmitted globally spread disease in humans. The incidence varies depending on the region and a consistent increase is observed since 2000 in western industrial nations with an actual level of 2-4 cases per 100,000 population per year (1).

The clinical course of Syphilis is characterized by different stages with varying symptoms. Infection occurs by sexual contacts. Skin lesions but also intact mucosa in the genital, oral or anal region are the most likely sites of entry for the pathogen and from there it spreads via blood and lymph vessels. During this primary stage a painless ulcer (ulcus durum) develops at the site of entry and a swelling of the regional lymph nodes (lymphadenopathy). Without treatment the infection will enter into the secondary stage after 9-10 weeks. Clinical signs are patchy papular exanthema or other ulcerative skin irritations, accompanied by several less characteristic symptoms like lymphadenopathy, fatigue, weight loss, subfebrile temperatures etc. The papular skin rashes contain a large number of pathogens. In the course of the secondary stage, which lasts between weeks to months, specific antibodies are produced. Nevertheless reinfections may occur. After decline of the symptoms and a latency period of up to several years the tertiary stage with a wide range of symptoms depending on the respective organ manifestations develops. Involvement of the central nervous system results in the clinical picture of Neurosyphilis or other neurological manifestations (1, 2).

Connatal *T. pallidum* infection by transplacental transmission during pregnancy causes spontaneous abortion, premature birth or stillbirth in 40% of the cases. About 50-70% of infected neonates are clinically unspectacular. Otherwise symptoms like bloody rhinitis, skin and mucosa irritations, fever, oedema, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, enteritis, hydrocephalus and meningitis may occur. In rare cases clinical symptoms do not develop before early childhood (3, 4).

Antibiotic treatment with Penicillin G is the method of choice for Syphilis therapy. Alternative antibiotics are tetracyclines and cephalosporines (3).

Treponema pallidum infections are diagnosed either by direct (pathogen detection or PCR) or indirect (serology) methods.

Direct pathogen detection from aspirates or smears of primary lesions, lymph nodes or exanthema by dark-field microscopy or direct immune fluorescence is hampered by the necessity to test the samples immediately after collection. Nucleic acid amplification techniques like PCR from aspirates, smears, blood or liquor are available but the diagnostic relevance is currently questionable (2, 5).

Laboratory diagnosis of Syphilis is preferably performed by detection of *T. pallidum* specific antibodies in serum, plasma or liquor. A two-step algorithm comprising a first screening and a subsequent confirmatory test is recommended (1, 2, 6). *Treponema pallidum* hemagglutination test (TPHA) or *Treponema pallidum* particle agglutination test and a polyvalent, IgG, IgA and IgM antibody detecting enzyme immunoassay (ELISA) are suitable screening methods. A positive or questionable screening result must be checked by a confirmatory test.

The Fluorescence Treponema Antibody Absorption test (FTA-Abs test) is an established confirmatory test. Treponema fixed to the surface of glass slides serve as target antigens for antibody detection from patient samples. In order to reach satisfying test specificity potentially cross reactive antibodies have to be eliminated by absorption with *Treponema phagedenis*. Immunoblots or line immunoassays are also suitable confirmatory tests (2, 4, 7). The major advantage of line immunoassays is the use of defined, highly purified recombinant antigens (Tp47, Tp17, Tp15 and TmpA), that are confirmed as *T. pallidum* specific (8). Therefore cross reactions appear unlikely and an absorption step is not needed (7). For differentiation between acute and recent infections confirmatory testing should always include the separate detection of IgG and IgM antibodies. Either immunoblot or line immunoassay or 19S-IgM-FTA-Abs test can be used to detect specific IgM antibodies for evaluation of the activity of the infection. Since IgM antibodies may persist for months up to years, a positive IgM result must always consider clinical findings for therapeutic decisions (2).

Quantitative detection methods like IgM-ELISA, 19S-IgM-Test or Lipoid antibody detection (e.g. VDRL-test, Cardiolipin-KBR) are recommended for serological follow-up after therapy (2, 4, 6).

Literature:

1. Thomas, L. (Hrsg): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main; 5. Auflage 1998
2. Hagedorn, H.-J.; Brockmeyer, N.H.; Hunfeld, K.P.; Münstermann, D.; Potthoff, A.; Schöfer, H.: Syphilis. Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MIQ) 16; Urban und Fischer, München; 2. Auflage 2012
3. Brandis, H.; Eggers, H.J.; Köhler, W.; Pulverer, G. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York; 7. Völlig neu bearbeitete Auflage 1994
4. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) online (Hrsg.): Diagnostik und Therapie der Syphilis. Leitlinien der Deutschen STD Gesellschaft. 07/2008
5. Bundesministerium für Gesundheit (Hrsg.): *Treponema pallidum*. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2002; 45: 818-826
6. Neumeister, B.; Geiss, H.K.; Braun, R.W.; Kimmig, P. (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 2. Vollständig überarbeitete Auflage 2009
7. Larsen, S.A.; Steiner, B.M.; Rudolph, A.H.: Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 1995; Vol. 8, No. 1; p1-21
8. Sambri, V.; Marangoni, A.; Eyer, C.; Reichhuber, C.; Soutschek, E.; Negosanti, M.; D'Antuono, A.; Cevenini, R.: Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, May 2001; Vol. 8, No. 3; p.534-539

Intended use

The *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM is an *in vitro* diagnostic device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of *Treponema pallidum*-specific IgG or IgM antibodies in human serum or plasma samples. The test can be used as a confirmatory test after a positive or a questionable result of a syphilis screening test (TPHA- TPPA- or TPLA-test).

Principle of the test

The *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM test is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant *Treponema* antigens as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96 well-microtiter plates. The recombinant antigens serve as capture molecules for antibodies against *Treponema* antigens. Bound antibodies are detected by Horseradish Peroxidase-(HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG- or IgM-type by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). At the site of formed immune complexes blue spots are developed by precipitated product from colorless substrate solution. Color intensity correlates to the antibody concentration. Pale blue to dark blue spots are visible by eye.

The test procedure for antibody detection is performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 minutes at room temperature in the intended wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 2

Incubation of wells with anti-human IgG- or IgM-HRP-conjugate for 30 minutes at room temperature. After incubation the antibody is aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 3

Incubation of wells with the substrate solution SeramunBlau[®] spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate solution, followed by tapping the plate/strip dry onto lint-free absorbent paper. The coloring of the developed arrays is stable when stored protected from light

After finishing step 3, developed assays can be scanned within 24 hours either by using the Seramun *SpotSight*[®] plate or Seramun *SpotSight*[®] strip scanner; the obtained images are interpreted by using the Software Seramun *SpotSight*[®] scan. Taking account of the test-specific evaluation criteria, the test result is determined.

Used Treponema antigens

Nomenclature	Characterization	Specificity
Tpp15	<i>Treponema pallidum</i> protein 15	15 kD
Tpp17	<i>Treponema pallidum</i> protein 17	17 kD
Tpp47	<i>Treponema pallidum</i> protein 47	47 kD
TmpA	<i>Treponema</i> membrane protein A	37 kD

Kit components

		For 48 determinations	For 96 determinations	For 2 x 96 determinations	
1	WELLS	Wells with arrays	6 single breakable 8-well strips in frame Vacuum sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame Vacuum sealed with desiccant	2 x 12 single breakable 8-well strips in frame separately vacuum sealed with desiccant
IgG detection: color coding black; IgM detection color coding white					
2	WASHBUF CONC 10X	Wash buffer Seramun® Wash buffer A	100 ml concentrate transparent bottle white cap	100 ml concentrate transparent bottle white cap	2x 100 ml concentrate transparent bottle white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cap	2x 55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cap	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cap
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle red cap	8 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle red cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle red cap
	CONJ HRP IgM	Anti-human IgM-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored green transparent bottle green cap	8 ml ready-to-use solution, colored green transparent bottle green cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored green transparent bottle green cap
5	SUBSTR TMB	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle blue cap	8 ml ready-to-use solution, black bottle blue cap	2x 8 ml ready-to-use solution, black bottle blue cap
6	COVER	Adhesive film	2x	2x	4x
7	SWAB	Swab with 70% (v/v) Isopropyl alcohol	3x2	6x2	12x2

Preparation and storage of samples

Sample collection should be done in a sterile manner. Serum is separated after clotting by centrifugation as soon as possible. Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 101 (10 µl sample and 1000 µl sample diluent) with the ready to use sample diluent.

Materials required but not provided

- Adjustable single-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Adjustable multi-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Reagent container for multi-channel micro-pipettes
- Distilled or deionized water
- Lint-free absorbent paper
- Test tubes (1 ml) for sample dilution
- Beaker and measuring cylinder
- stop watch
- Washer for 96-well microtiter plates (optional)
- Collecting devices for infectious material
- Seramun *SpotSight*® plate or Seramun *SpotSight*® strip scanner with evaluation software Seramun *SpotSight*® scan

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 48, 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 3 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used up to 4 weeks when stored at 2...8 °C and up to 2 weeks when stored at room temperature.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed. Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting one part of the wash buffer concentrate **WASHBUF CONC 10X** with 9 parts of distilled or deionized water. For Example: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml distilled water and vortex thoroughly. The substrate solution **SUBSTR TMB** must be protected from direct light! The test should not be performed with a substrate solution **SUBSTR TMB** that is colored dark or contains colored precipitates!

Workplace requirements

Processing the spotimmunoassays requires a clean and lint-free workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells has to be avoided. Fibers may disturb optical image generation of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Assay procedure

Performance at room temperature (18...25 °C) and at the specified incubation times.

For the handling of *SeraSpot*[®] tests the use of the starter kit (order number: SP-000-1) is recommended. The kit is designed for multiple use.

Important notes:

- **Avoid any contact or scratching on the bottom surface of the wells by pipette tips or washer needles. This results in irreparable damages of the spot array.**
- **All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted without causing air bubbles into the wells.**
- **Before starting imaging of the wells it is necessary to remove particles or fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells using the swab **SWAB** provided in the kit.**
- **Due to the drying of residual liquid, the images may appear more contrast-intensive, which can lead to slight deviations of the measured values during repeated scanning. Evaluation of the individual parameters is not changed!**

Working steps

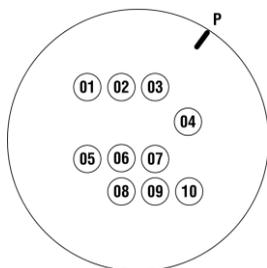
1. Warm all reagents to room temperature before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1 : 101 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 1000 µl sample dilution buffer.
3. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
5. Add **50 µl** of the ready-to-use conjugate solution **CONJ HRP IgG** or **CONJ HRP IgM** to each well.
6. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
7. Empty wells (aspirate and discard conjugate), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
8. Add **50 µl** of the ready-to-use substrate solution **SUBSTR TMB** to each well.
9. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at room temperature.
10. Empty wells (aspirate and discard substrate). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
11. Clean bottom of wells with Swab **SWAB**.
12. Perform image acquisition using the Seramun *SpotSight*[®] plate or the Seramun *SpotSight*[®] strip scanner and evaluate the results with the Seramun *SpotSight*[®] scan software. If image acquisition is performed with the scanner Seramun *SpotSight*[®] strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

Aspiration and washing steps can be performed manually or via washer for 96-well microtiter plates.

After aspiration of the substrate solution, the color of developed spots is stable for 24 hours when the plate is stored in the dark.

Test evaluation

Array layout



Parameter

04	TppA
05	Tpp15
06	Tpp17
07	Tpp47

Controls

01	Positive control (PC)
02	Cut-off control (CO)
03	Negative control (NC)
08	IgG conjugate control (GC)
09	IgM conjugate control (MC)
10	Serum control (SC)

P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM test includes the following control spots:

1. Positive control (PC). Intensively stained spot, darker than cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO). Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC). Pale spot with intensity lower than Cut-off control
4. IgG, IgM conjugate control (GC, MC). Intensively stained spots with different position for IgG and IgM antibody detection. Serving as antibody isotype control.
5. Serum control (SC). Intensively stained spot always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1 to 5 is not fulfilled.

Result interpretation

Evaluation of the test has to be performed by using the *Seramun SpotSight*[®] scan software. A visual plausibility check is possible with the aid of the magnifying lens contained in the starter kit (order number: SP-000-1).

Judgment of spot staining is performed according to the following classification:

Result Interpretation	IgG	IgM
negative	max. one antigen spot > Cut-off control	no antigen spot > Cut-off control
borderline	-	one antigen spot > Cut-off control
positive	two or more antigen spots > Cut-off control	two or more antigen spots > Cut-off control

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

The interpretation of isolated positive IgM results in sera from pregnant woman should consider the possibility of the presence of multireactive IgM antibodies (for further information see "Introduction").

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples (concentrations up to 500 mg/dl hemoglobin, 1000 mg/dl lipids and 20 mg/dl bilirubin C / bilirubin F) do not interfere with the test. Rheumatoid factors also do not interfere with the test.

Assay procedure

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the wells or incorrect timing can produce erroneous results.

Air bubbles generated by too forceful pipetting of samples and/or reagents may cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be used for evaluation.

Damaged arrays e.g. by scratching the well bottom with pipet tips or washer needles are not suitable for evaluation.

Any kind of fibers which may stick underside the bottom of the wells or to the array area cause erroneous results.

Performance characteristics

Diagnostic sensitivity

A collection of 231 and 203 samples, characterized by a reference test (line immunoassay) were tested in the *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM test ("Initial sensitivity"). Samples with discrepant results were re-analyzed in a second reference assay. The results obtained in the reference test 2 were used for determination of the final status of the samples with discrepant results ("Amended sensitivity").

IgG	n = 231	Reference test 1		
		positive	borderline	negative
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Treponema-4 IgG	positive	210	2	5
	borderline	./.	./.	./.
	negative	3	0	11

Borderline samples are valued positive.

Initial sensitivity: **98.6 %**

Amended sensitivity: **98.6 %**

IgM	n = 203	Reference test 1		
		positive	borderline	negative
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Treponema-4 IgM	positive	56	0	0
	borderline	17	17	7
	negative	1	4	101

Borderline samples are valued positive.

Initial sensitivity: **94.7 %**

Amended sensitivity: **95.7 %**

Diagnostic specificity

A collection of 382 blood donor samples were tested in the *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM test in comparison to a reference test (line immunoassay). Samples with discrepant results were re-analyzed in a second reference test and assessed as described in "Diagnostic sensitivity".

IgG	n = 382	Reference test 1		
		positive	borderline	negative
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Treponema-4 IgG	positive	0	0	0
	borderline	./.	./.	./.
	negative	0	0	382

Specificity: **100.0 %**

IgM	n = 382	Reference test		
		positive	borderline	negative
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Treponema-4 IgM	positive	0	0	0
	borderline	0	0	8*
	negative	0	0	374

Borderline samples are valued positive.

* 2 samples were confirmed borderline and 1 sample was confirmed positive by a second reference test.

Initial specificity: **97.9 %**

Amended specificity: **98.7 %**

Cross-reactivity

Serum samples from pregnant women (n=51) were analyzed by *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM test. All samples were tested negative for IgG antibodies (specificity 100 %) and 2 samples positive for IgM antibodies (initial specificity 96.1 %). 1 sample was confirmed positive by a second reference test (amended specificity 98.0 %).

Precision

Samples of known antibody titer were analyzed by *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgM test. Color intensity (RAW) of spots was recorded and the coefficients of variation (CV) were calculated.

IgG detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	RAW [\bar{x}] n = 8	CV [%]	RAW [\bar{x}] n = 48	CV [%]	RAW [\bar{x}] n = 144	CV [%]
Tpp15	54.6	6.7	111.7	9.7	63.9	8.8
Tpp17	120.2	3.1	110.3	7.6	73.5	9.6
Tpp47	107.0	6.4	103.3	7.7	92.0	8.7
TmpA	112.3	5.3	98.1	6.1	113.7	11.0
Procedure	1 operator. 8x determination. 1 batch		1 operator. 8x determination. 2x testing per day. 3 days. 1 batch		1 operator. 8x determination. 2x testing per day. 3 days. 3 batches	

IgM detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	RAW [\bar{x}] n = 8	CV [%]	RAW [\bar{x}] n = 48	CV [%]	RAW [\bar{x}] n = 144	CV [%]
Tpp15	72.0	9.8	48.2	10.7	79.8	13.3
Tpp17	111.7	8.2	76.6	8.5	116.8	10.3
Tpp47	50.9	9.1	74.4	12.5	56.0	16.6
TmpA	69.5	10.9	59.7	12.1	66.1	11.5
Procedure	1 operator. 8x determination. 1 batch		1 operator. 8x determination. 2x testing per day. 3 days. 1 batch		1 operator. 8x determination. 2x testing per day. 3 days. 3 batches	

Automation

Samples of known antibody titer (n=96 IgG and n=64 IgM) were assayed manually or by use of the microplate processor DS2[®] (Dynex Technologies; manual sample dilution). Color intensity (RAW) of antigen spots was recorded and used for calculation of the coefficient of determination r² for selected antibody reactivities and the different methods of operation.

Ig-Isotyp detection	Dynex DS2 [®] vs. manual processing	
	r ² IgG	r ² IgM
Tpp15	0.979	0.968
Tpp17	0.979	0.990
Tpp47	0.975	0.980
TmpA	0.979	0.970

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical staff only. The test instructions have to be followed strictly. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, washing buffer and TMB substrate solution. These can be used across batches and parameters.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8 °C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

In particular the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



History of changes

Version	Section	Modifications
2019-06-XX	General Preparation and storage of reagents	General revision Storage of ready-to-use wash solution

Incubation scheme *SeraSpot*[®] Anti-Treponema-4 IgG / IgM

1.  100 µl diluted sample (1 : 101)
30 min incubation (room temperature)

 3 x wash with washing solution. each 400 µl per well
2.  50 µl conjugate **CONJ HRP IgG** or **CONJ HRP IgM**
30 min incubation (room temperature)

 3 x wash with washing solution. each 400 µl per well
3.  50 µl substrate **SUBSTR TMB**
30 min incubation (room temperature. protected from light)

 aspiration
4. imaging of wells and image analysis scanner Seramun *SpotSight*[®] plate / Seramun *SpotSight*[®] strip and software Seramun *SpotSight*[®] scan

 Manufacturer	 Date of manufacture	 Use by	LOT Batch code	REF Catalog number
 Keep away from sunlight	 Temperature limits	 Biological risks	 Do not reuse	
 Consult instructions for use	 Caution	IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device	 Contains sufficient for <n> tests	

SeramunBlau[®], *SeraSpot*[®] und Seramun *SpotSight*[®] are registered trademarks of Seramun Diagnostica GmbH.